

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年9月29日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2005/090604 A1**

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
C12N 15/09, G01N 21/78, 33/53, 33/566

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006405

(22) 国際出願日: 2005年3月18日 (18.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-080703 2004年3月19日 (19.03.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP).

(72) 発明者; よび

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 寺前 紀夫 (TERAMAE, Norio) [JP/JP]; 〒9800861 宮城県仙台市青葉区

川内元支倉 35-1-501 Miyagi (JP). 西沢 精一 (NISHIZAWA, Seiichi) [JP/JP]; 〒9810952 宮城県仙台市青葉区中山5-18-5-504 Miyagi (JP). 吉本敬太郎 (YOSHIMOTO, Keitaro) [JP/JP]; 〒3510111 埼玉県和光市下新倉1413-210 Saitama (JP). 清野 丈博 (SEINO, Takehiro) [JP/JP]; 〒9820833 宮城県仙台市太白区八木山弥生町19-5-202 Miyagi (JP). 佐藤 冬樹 (SATO, Fuyuki) [JP/JP]; 〒9810967 宮城県仙台市青葉区山手町25-30 Miyagi (JP).

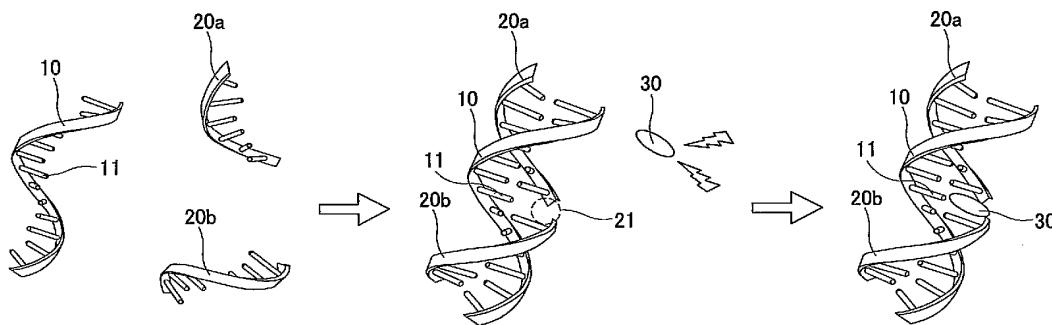
(74) 代理人: 小池 晃, 外 (KOIKE, Akira et al.); 〒1000011 東京都千代田区内幸町一丁目1番7号 大和生命ビル11階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

/続葉有/

(54) Title: METHOD OF DETECTING GENE MUTATION AND KIT FOR DETECTING GENE MUTATION

(54) 発明の名称: 遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キット



A1

(57) Abstract: A solution containing a single-stranded nucleic acid (10) having a target base (11) relating so SNP, etc. is mixed with another solution containing two nucleic acids (20a) and (20b) for detecting single strand, which are complementary to each other concerning a partial sequence containing the target base (11), and thus the target nucleic acid (10) is hybridized with the nucleic acids (20a) and (20b) for detection, thereby intentionally constructing a gap site (21) at a site opposite to the target base (11). Next, a receptor molecule (30) showing hydrogen bond properties and fluorescence is inserted into the gap site (21) which is a hydrophobic field space. Subsequently, a change in the fluorescent intensity of the receptor molecule (30) depending on the difference in the target base (11) is detected to thereby detect a single nucleotide polymorphism.

WO 2005/090604 A1

(57) 要約: SNP等に関連する標的塩基(11)を有する一本鎖の標的核酸(10)を含む溶液と、標的塩基(11)を挟む部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸(20a), (20b)を含む溶液とを混合し、標的核酸(10)と検出用核酸(20a), (20b)とをハイブリダイゼーションすることで、標的塩基(11)と対向する部位に意図的にギャップ部位(21)を構築する。そして、疎水場空間であるこのギャップ部位(21)に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプター分子(30)を挿入する。その後、標的塩基(11)の違いに基づくレセプター分子(30)の蛍光強度変化を検出し、一塩基置換を検出する。



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/006405

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKATANI K. et al., Improved selectivity for the binding of naphthyridine dimer to guanine-guanine mismatch., Bioorg.Med.chem., 2001, September, 9(9), p.2381-5	7
P,X P,Y	JP 2004-261068 A (Norio TERAMAE), 24 September, 2004 (24.09.04), (Family: none)	1-4, 9-11 5-8
A	JP 2001-149096 A (Japan Science and Technology Corp.), 05 June, 2001 (05.06.01), & US 6607890 B1 & EP 1164202 A1 & WO 2001/038571 A1	1-11
A	NAKATANI, K. et al., Recognition of Guanine-Guanine mismatches by the dimeric form of 2-amino-1, 8-naphthyridine, J.Am.Chem.Soc., 2001, 123, pages 12650 to 12657	1-11

## 明細書

## 遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キット

## 技術分野

本発明は、バイオインフォマティクス（生命情報科学）分野において特に有用な遺伝子変異検出方法及びその方法を用いた遺伝子変異検出用キットに関し、特に遺伝子配列における一塩基置換等を簡便且つ迅速に検出する遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットに関する。

本出願は、日本国において2004年3月19日に出願された日本特許出願番号2004-080703を基礎として優先権を主張するものであり、この出願は参照することにより、本出願に援用される。

## 背景技術

ヒトゲノム配列が解読された今日の研究目標の1つは、遺伝子の同定、機能の解析、さらに遺伝子発現や機能に影響して個体差を決める遺伝子の多様性である。ここで、核酸塩基配列中の一塩基の違いから生じる遺伝子の個体差のことを一塩基変異と呼ぶ。この一塩基変異の中でも頻度の多い変異のことを一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism；S N P）と呼び、遺伝子中に点在するS N Pが各種疾患と強く関連することが明らかとなっている。

現在、S N Pを含む遺伝子変異の検出方法としては、制限酵素で切断したD N A断片をゲルにより分離した後、色素でD N A断片を染色・検出するという電気泳動法が挙げられる。この方法は汎用されているものの、分離や染色に必要な時間が長く、迅速性に欠けるという問題があった。

また、マイクロアレイ技術によって所定のD N Aが微細配列された、いわゆるD N Aチップと呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板も、遺伝子変異の検出に利用され始めている。このD N Aチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種多

数のDNAオリゴヌクレオチド鎖やcDNA等が集積されていることから、一度に多数の遺伝子検査が可能であり、臨床検査現場等への適用が期待されている。しかしながら、核酸塩基のミスマッチ形成に由来する二本鎖DNAの安定性を原理とする手法であるため、塩基配列によってはその温度制御が困難であり、さらに放射性物質や蛍光色素を被検体自体に修飾する前処理が必要である等の問題があつた。

さらに、被検体の增幅と検出を同時に行うリアルタイムPCR法が、核酸増幅法による一段階の迅速な定量測定の技術として、近年普及しつつある。しかしながら、増幅反応における複雑な温度制御、プローブの導入も含めた各遺伝子配列に適用するプライマーの設計が複雑である上に、増幅装置や条件によって結果が異なる場合も少なからずあり、再現性の面においても課題を残している。また、シグナルの経時変化を利用して検出を行うため、若干操作性に欠けるという問題があつた。

このように、従来の遺伝子変異を検出する技術は、精密な温度制御や煩雑な被検体の前処理が必要である、或いは測定までの時間が長い等の問題があり、簡便且つ迅速に遺伝子検査を行うことが不可能であった。

そこで、本件発明者らは、文献「K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa and N. Teramae, "Use of Abasic Site-Containing DNA Strands for Nucleobase Recognition in Water", J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, pp. 8982-8983」

(以下、文献1という。)において、一塩基置換部位を有する一本鎖の標的DNAと、この標的DNAと相補的であり、且つ一塩基置換部位に対応する対応塩基を除いて脱塩基部位(AP site)とした一本鎖の検出用DNAとで二本鎖核酸を形成させ、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプター分子を添加して一塩基置換部位と水素結合を形成させ、このレセプター分子の蛍光強度変化を測定することにより、一塩基置換を効果的に検出する技術を提案している。

この文献1記載の技術は、被検体となる標的DNAのラベル化や熱制御等の煩雑な操作が原則的に不要であるため工程数が非常に少なく、また、原理上二本鎖DNA自体の熱的な安定性に依存しないため、検出までの時間が非常に短時間であり、再現性にも優れている。また、UVランプを用いた目視による確認も可能

であるため、特別な設備を持たない状況下においても検出が可能である。

しかしながら、この文献 1 記載の技術では、検出用 DNA を蛍光標識する等の化学修飾は必要ないものの、脱塩基部位という特殊な部位を導入する必要があり、これが厳密な意味では化学修飾に相当してしまうという問題があった。また、脱塩基部位を導入するため、検出用 DNA を合成する際のコストが高くなるという問題があった。

### 発明の開示

本発明は、このような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、標的DNA及び検出用DNAに対する化学修飾を行うことなく、簡便且つ迅速に遺伝子変異を検出する遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットを提供すること目的とする。

上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出方法は、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と、上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とで、二本鎖核酸を形成する工程と、上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプターを挿入させ、上記標的塩基と水素結合を形成させる工程と、上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度を測定する工程とを有する。

また、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出用キットは、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、水素結合性及び発蛍光性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターとを有する。

このような遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットでは、標的核酸と 2 種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成することにより二本鎖核酸に意図的にギャップ部位を構築し、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプターを添加してギャップ部位にレセプターを挿入させ、標的塩基と水素結合を形

成させた後、レセプターが挿入された二本鎖核酸の蛍光強度を測定することにより、標的塩基に生じた遺伝子変異を検出する。

なお、上記レセプターとしては、例えばナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、ブテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体、アロキサジン誘導体、或いはアミロライドが使用可能である。

ここで、上記レセプターは、基板に固定化されていても構わない。

すなわち、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出方法は、水素結合性を示すレセプターが固定化された基板に、連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸とを滴下することにより、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程とを有する。

また、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出用キットは、連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸と、水素結合性を示し、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、上記レセプターが固定化された基板とを有する。

このような遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットでは、標的核酸と2種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成することにより二本鎖核酸に意図的にギャップ部位を構築し、水素結合性を示すレセプターが固定化された基板にこの二本鎖核酸を滴下することによりギャップ部位にレセプターを挿入させて標的塩基と水素結合を形成させた後、標的塩基とレセプターとの結合に基づいて標的塩基に生じた遺伝子変異を検出する。この場合、レセプターが発蛍光性を示すものであればレセプターが挿入された二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて標的塩基を識別することができる。また、標的塩基とレセプターとの結合に基づく表面プラズモン共鳴の信号強度変化、又は水晶振動子の共振周波数変化に基づいて標的塩基を識別することも可能である。

また、上記 2 種類の検出用核酸の一方は、基板に固定化されていて構わない。

すなわち、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出方法は、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸のうち一方の検出用核酸が固定化された基板に、上記標的核酸と、他方の検出用核酸と、水素結合性を示すレセプターとを滴下することにより、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程とを有する。

また、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出用キットは、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、水素結合性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、2 種類の上記検出用核酸の一方が固定化された基板とを有する。

このような遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットでは、2 種類の検出用核酸のうち一方の検出用核酸が固定化された基板に、標的核酸と、他方の検出用核酸と、水素結合性を示すレセプターとを滴下することにより、標的核酸と 2 種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させて二本鎖核酸に意図的にギャップ部位を構築し、このギャップ部位にレセプターを挿入させて標的塩基と水素結合を形成させた後、標的塩基とレセプターとの結合に基づいて標的塩基に生じた遺伝子変異を検出する。この場合、レセプターが発蛍光性を示すものであれば、レセプターが挿入された二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて標的塩基を識別することができる。

本発明のさらに他の目的、本発明によって得られる具体的な利点は、以下に説明される実施例の説明から一層明らかにされるであろう。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本実施の形態における遺伝子変異検出の原理を説明する図である。

図 2 は、レセプター分子が基板に固定化されている場合の遺伝子変異検出の原理を説明する図である。

図 3 は、検出用核酸の一方が基板に固定化されている場合の遺伝子変異検出の原理を説明する図である。

図 4 は、標的塩基がグアニン、シトシンである場合について、AMND 添加後の蛍光スペクトルを示す図である。

図 5 は、標的塩基がグアニン、シトシンである場合について、AMND 添加後の蛍光を示す図である。

図 6 は、標的塩基がグアニン、シトシン、アデニン、チミンである場合について、AMND 添加後の蛍光消光効率を示す図である。

図 7 は、標的塩基がグアニン、シトシン、アデニン、チミンである場合について、DiMe-pteridine添加後の蛍光消光効率を示す図である。

図 8 は、標的塩基がグアニン、シトシン、アデニン、チミンである場合について、アミロライド添加後の蛍光消光効率を示す図である。

図 9 は、PCR 増幅した標的核酸の標的塩基がグアニン、シトシン、アデニン、チミンである場合について、AMND 添加後の蛍光消光効率を示す図である。

図 10 は、標的塩基がグアニン、シトシン、アデニン、チミンである場合について、AMND-DPA を固定化したセンサーチップの SPR 信号強度を示す図である。

図 11 は、標的塩基がグアニン、シトシン、アデニン、チミンである場合について、AcMND-C5A を固定化したセンサーチップの SPR 信号強度を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

一般に、水素結合を利用する核酸塩基認識では、レセプター分子の水素結合様式や数を変化させることで、比較的容易に高い塩基選択性を獲得できる特徴を持つ。この際、完全水溶液中では水素結合形成に基づく認識機能の発現は期待でき

ないため、従来の研究の多くは、クロロホルム中のような無極性溶媒環境下に限定されていたが、溶媒中の核酸が変性、沈殿する要因ともなっていた。

そこで、本実施の形態では、図1に概念的に示すように、S N P等に関連する標的塩基11を有する一本鎖の標的核酸10を含む溶液と、標的塩基11を挟む部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bを含む溶液とを混合し、標的核酸10と検出用核酸20a, 20bとをハイブリダイゼーションさせることで、標的塩基11と対向する部位に意図的にギャップ部位21を構築する。そして、疎水場空間であるこのギャップ部位21に水素結合性を示すレセプター分子30を挿入し、標的塩基11と水素結合を形成させる。

このように、疎水場空間であるギャップ部位21に水素結合性を示すレセプター分子30を挿入し、標的塩基11と水素結合を形成させることで、完全水溶液中においても効果的に核酸塩基認識を行い、標的塩基11の変異を検出することができる。

また、標的核酸10の複数塩基を挟む部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bを含む溶液を用いるようにすれば、複数塩基の変異を検出することができる。この場合、例えば2塩基分をギャップ部位21とすると、このギャップ部位21には2分子のレセプター分子30が挿入される。

ここで、本実施の形態で分析可能な標的核酸10としては、例えばヒトを含む哺乳類や植物由来のDNA、cDNA等が挙げられるが、特に限定されず、必要に応じて希釈、濃縮、増幅を行う。

また、水素結合性を示すレセプター分子30としては、水素結合部位を有し、発蛍光性を示す試薬が望ましい。具体的には、水素結合部位を少なくとも一段、好ましくは複数段有し、ギャップ部位21に隣接する核酸塩基とスタッキングできるような複素環式芳香族基を有する試薬が望ましい。特に水溶性の試薬が好ましいが、非水溶性の場合には有機溶媒を微量用いることにより、対応が可能である。このようなレセプター分子30としては、例えばナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、ピテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体、アロキサジン誘導体、或いはアミロライド等が挙げられる。

なお、上述の例では、遊離した標的核酸10と遊離した検出用核酸20a, 2

0 bとを溶液中で反応させるものとして説明したが、これに限定されるものではない。

例えば、図2に模式的に示すように、リンカー分子41を介してレセプター分子30を基板40に固定化し、この基板40上に標的核酸10及び検出用核酸20a, 20bを含む溶液を滴下するようにしても構わない。また、図3に模式的に示すように、リンカー分子41を介して検出用核酸20aを基板40に固定化し、この基板40上に標的核酸10及び検出用核酸20bとレセプター分子30とを含む溶液を滴下するようにしても構わない。

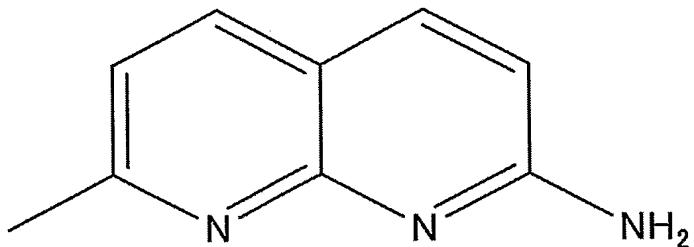
このようにして、レセプター分子30又は検出用核酸20aを基板40上に多数集積したセンサーチップ（マイクロアレイ）を作製し、遺伝子変異検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな検出が可能となる。

図2に示す構成の場合、蛍光強度の変化ではなく、表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance ; S P R）の信号強度の変化を利用して遺伝子変異を検出することも可能である（例えば文献「Kazuhiko Nakatani, Shinsuke Sando, and Isao Saito, Nat. Biotechnol., 2001, 19, pp. 51-55」、文献「Akio Kobori, Souta Horie, Hitoshi Suda, Isao Saito, and Kazuhiko Nakatani, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, pp. 557-562」を参照。）。また、図2に示す構成の場合、水晶振動子の共振周波数の変化を利用して遺伝子変異を検出することも可能である。

以下、本発明の具体的な実施例について図面を参照しながら詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能であることは勿論である。

#### （第1の実施例）

第1の実施例では、レセプター分子として、以下の化学式に示すようなナフチリジン誘導体である2-アミノ-7-メチル-1, 8-ナフチリジン（AMND）を用いた。このAMNDは、文献「E. V. Brown, J. Org. Chem., Vol. 30, p1607, 1965」を参考にして、2, 6-ジアミノピリジンから合成したものである。

化 1

このAMNDは発蛍光性を示し、後述するように、2種類の検出用DNA間のギャップ部位に挿入されたときに標的塩基と相互作用し、標的塩基の違いに基づき蛍光強度が変化するため、蛍光強度を測定することで一塩基置換を検出することができる。特に、このAMNDは標的塩基としてのC（シトシン）と選択的に相互作用するため、C（シトシン）が関与する全ての一塩基置換（C／T, C／G, C／A）を検出することができる。

ここで、DNAとAMNDとを混合する際、AMNDは、該AMNDを含有する溶液の形態で混合してもよく、粉末や固形状の形態で混合してもよい。また、蛍光測定は、UVランプを用いて目視で行ってもよく、蛍光分光器、蛍光顕微鏡、デンシトメーター等の機器を用いてもよい。

本実施例では、AMNDによる一塩基置換検出（C／G）の効果を検証するために、以下のような23merの標的DNA（配列a）とそれぞれ11merの2種類の検出用DNA（配列b, c）とをモデル配列として準備した。ここで、配列a中、SはG（グアニン）又はC（シトシン）を示す。

(配列a) 5' - T C T C C G C A C A C S T C T C C C C A C A C - 3' (配列番号1)

(配列b) 5' - G T G T G C G G A G A - 3' (配列番号2)

(配列c) 5' - G T G T G G G G A G A - 3' (配列番号3)

具体的に、本実施例では、被検体となる600μMの標的DNA溶液（上記配列a）とそれぞれ600μMの2種類の検出用DNA溶液（上記配列b, c）とをそれぞれ25μl、イオン強度調整剤として500mM NaCl溶液を50μ

1、pH緩衝剤として5 mM EDTAを含む50 mM カコジル酸ナトリウム溶液を50 μl、150 μM AMND溶液を50 μl混合し、MilliQ水を加えて全量を250 μlとした。得られたDNA溶液についてサーマルサイクラーでアニーリング処理を行い、蛍光強度を測定した。蛍光測定には、光路長2 mm × 10 mmの蛍光測定用セルを用いた。

標的DNAを加えなかった場合(DNA free)の蛍光スペクトルと、標的DNAの標的塩基SがG(グアニン), C(シトシン)である場合の蛍光スペクトルとを図4に示す。ここで、図4における励起波長は350 nmである。図4に示すように、標的塩基SがC(シトシン)である場合に蛍光が著しく消光している。これは、AMNDがギャップ部位に隣接する核酸塩基とスタッキングし、さらに標的塩基(C)との水素結合形成により安定な会合体を形成しているためと考えられる。このように、消光の有無を検出することで、標的塩基YがG(グアニン)であるかC(シトシン)であるかを知ることができる。

同じDNA溶液をポリプロピレン製の透明チューブに入れ、励起波長350 nmのUVランプを用いて蛍光を目視検出した結果を図5に示す。図5には、標的DNA及び検出用DNAのみが含まれた溶液とAMNDのみが含まれた溶液とをそれぞれ透明チューブに入れた場合の蛍光も併せて示す。図5に示すように、標的塩基SがC(シトシン)である場合に蛍光が著しく消光しており、目視でも確認可能である。

#### (第2の実施例)

第2の実施例では、レセプター分子として第1の実施例と同様のAMNDを用いて、C(シトシン)が関与する全ての一塩基置換検出(C/T, C/G, C/A)への適用性を評価した。

本実施例では、AMNDによる一塩基置換検出(C/T, C/G, C/A)の効果を検証するために、以下のような107merの標的DNA(配列d)とそれぞれ15merの検出用DNA(配列e, f)とをモデル配列として準備した。ここで、配列d中、NはG(グアニン), C(シトシン), A(アデニン)又はT(チミン)を示す。

(配列d) 5' - C T A T T G T T G G A T C A T A T T C G T C C A C A A A

A T G A T T C T G A A T T A G C T G T A T C G T C A A G G C A C T C T T  
G C C T A C G C C A N C A G C T C C A A C T A C C A C A A G T T T A T A  
T T C A G T C - 3' (配列番号 4)

(配列 e) 5' - T G G C G T A G G C A A G A G - 3' (配列番号 5)

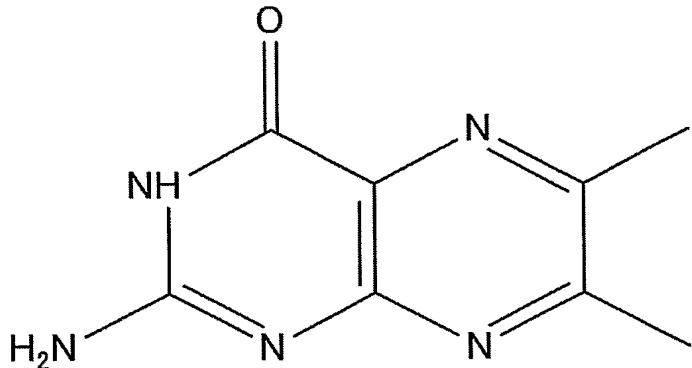
(配列 f) 5' - T G G T A G T T G G A G C T G - 3' (配列番号 6)

具体的に、本実施例では、被検体となる  $5 \mu M$  の標的一本鎖DNA溶液（上記配列 d） $5 \mu l$  に、 $5 \mu M$  の検出用DNA溶液（上記配列 e, f）を  $5 \mu l$  添加し、さらにイオン強度調整剤として  $500 mM NaCl$  溶液を  $10 \mu l$  、pH緩衝剤として  $5 mM EDTA$  を含む  $50 mM \alpha$ -コジル酸ナトリウム溶液を  $10 \mu l$  、 $5 \mu M AMND$  溶液を  $5 \mu l$  添加し、MilliQ水を加えて全量を  $50 \mu l$  とした。得られたDNA溶液についてサーマルサイクラーを用いてアニーリング処理を行い、蛍光強度を測定した。蛍光測定には、光路長  $3 mm \times 3 mm$  の蛍光測定用セルを用いた。

標的DNAの標的塩基NがG（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）又はT（チミン）である場合の蛍光消光効率（%）を図6に示す。ここで、蛍光消光効率は、標的DNAが存在しない場合の蛍光強度を  $F_{free}$  とし、標的DNAが存在する場合の蛍光強度を  $F_{obs}$  としたとき、 $((F_{free} - F_{obs}) / F_{free}) \times 100$  で表される。また、図6における励起波長は  $350 nm$  であり、検出波長は  $400 nm$  である。図6に示すように、標的塩基NがC（シトシン）である場合にのみ蛍光が著しく消光している。このように、消光の有無を検出することで、標的塩基NがC（シトシン）であるか否かを知ることができる。すなわち、AMNDをレセプター分子として用いることにより、C（シトシン）が関与する全ての一塩基置換検出が可能である。

### （第3の実施例）

第3の実施例では、レセプター分子として、以下の化学式に示すようなピテリジン誘導体である2-アミノ-6, 7-ジメチル-4-ヒドロキシピテリジン(DiMe-pteridine)を用いた。

化 2

このDiMe-pteridineは発蛍光性を示し、後述するように、2種類の検出用DNA間のギャップ部位に挿入されたときに標的塩基と相互作用し、標的塩基の違いに基づき蛍光強度が変化するため、蛍光強度を測定することで一塩基置換を検出することができる。特に、このDiMe-pteridineは標的塩基としてのG（グアニン）と選択的に相互作用するため、G（グアニン）が関与する全ての一塩基置換（G/C, G/A, G/T）を検出することができる。

本実施例では、DiMe-pteridineによる一塩基置換検出（G/C, G/A, G/T）の効果を検証するために、以下のような23merの標的DNA（配列g）と上述した11merの検出用DNA（配列b）とをモデル配列として準備した。ここで、配列g中、NはG（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）又はT（チミン）を示す。なお、本実施例における配列gは、標的塩基Nの前後の配列が同じであるため、1種類の検出用DNA（配列b）を標的DNA（配列g）に対して2当量加えることで、標的塩基Nと対向する部位にギャップ部位を構築した。

（配列g） 5' - T C T C C G C A C A C N T C T C C G C A C A C - 3' （配列番号7）

具体的に、本実施例では、被検体となる5μMの標的一本鎖DNA溶液（上記配列g）10μlに、10μMの検出用DNA溶液（上記配列b）を10μl添加し、さらにイオン強度調整剤として500mM NaCl溶液を10μl、pH

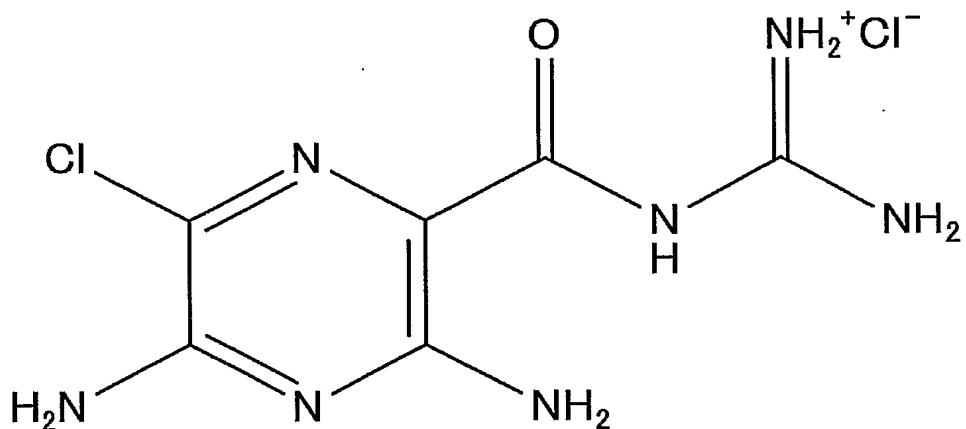
緩衝剤として 5 mM EDTA を含む 50 mM カコジル酸ナトリウム溶液を 10  $\mu$ l、1  $\mu$ M DiMe-pteridine 溶液を 5  $\mu$ l 添加し、MilliQ 水を加えて全量を 50  $\mu$ l とした。得られた DNA 溶液についてサーマルサイクラーを用いてアニーリング処理を行い、蛍光強度を測定した。蛍光測定には、光路長 3 mm  $\times$  3 mm の蛍光測定用セルを用いた。

標的 DNA の標的塩基 N が G (グアニン)、C (シトシン)、A (アデニン) 又は T (チミン) である場合の蛍光消光効率 (%) を図 7 に示す。ここで、図 7 における励起波長は 343 nm であり、検出波長は 435 nm である。図 7 に示すように、標的塩基 N が G (グアニン) である場合にのみ蛍光が著しく消光している。このように、消光の有無を検出することで、標的塩基 N が G (グアニン) であるか否かを知ることができる。すなわち、DiMe-pteridine をレセプター分子として用いることにより、G (グアニン) が関与する全ての一塩基置換検出が可能である。

#### (第 4 の実施例)

第 4 の実施例では、レセプター分子として、以下の化学式に示すようなアミロライド (N-amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride) を用いた。

#### 化 3



このアミロライドは発蛍光性を示し、後述するように、2種類の検出用 DNA 間のギャップ部位に挿入されたときに標的塩基と相互作用し、標的塩基の違いに

基づき蛍光強度が変化するため、蛍光強度を測定することで一塩基置換を検出することができる。特に、このアミロライドは標的塩基としてのT（チミン）と選択的に相互作用するため、T（チミン）が関与する全ての一塩基置換（T/G, T/C, T/A）を検出することができる。

本実施例では、アミロライドによる一塩基置換検出（T/G, T/C, T/A）の効果を検証するために、上述した23merの標的DNA（配列g）と上述した11merの検出用DNA（配列b）とをモデル配列として準備した。なお、本実施例においても、1種類の検出用DNA（配列b）を標的DNA（配列g）に対して2当量加えることで、標的塩基Nと対向する部位にギャップ部位を構築した。

具体的に、本実施例では、被検体となる5μMの標的一本鎖DNA溶液（上記配列g）10μlに、10μMの検出用DNA溶液（上記配列b）を10μl添加し、さらにイオン強度調整剤として500mM NaCl溶液を10μl、pH緩衝剤として5mM EDTAを含む50mM カコジル酸ナトリウム溶液を10μl、1μM アミロライド溶液を5μl添加し、MilliQ水を加えて全量を50μlとした。得られたDNA溶液についてサーマルサイクラーを用いてアニーリング処理を行い、蛍光強度を測定した。蛍光測定には、光路長3mm×3mmの蛍光測定用セルを用いた。

標的DNAの標的塩基NがG（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）又はT（チミン）である場合の蛍光消光効率（%）を図8に示す。ここで、図8における励起波長は361nmであり、検出波長は415nmである。図8に示すように、標的塩基NがT（チミン）である場合にのみ蛍光が著しく消光している。このように、消光の有無を検出することで、標的塩基NがT（チミン）であるか否かを知ることができる。すなわち、アミロライドをレセプター分子として用いることにより、T（チミン）が関与する全ての一塩基置換検出が可能である。

#### （第5の実施例）

第5の実施例では、レセプター分子として第1の実施例と同様のAMNDを用いて、PCR産物への適用性を評価した。

本実施例では、AMNDによるPCR産物への適用性を検証するために、上述

した 107mer の標的DNA（配列 d）と上述したそれぞれ 15mer の検出用DNA（配列 e, f）とをモデル配列として準備した。

ここで、本実施例における標的DNA（配列 d）は、K-ras遺伝子のcodon12を含む領域で、以下のようなフォワードプライマー（配列 h）及びリバースプライマー（配列 i）を用いて、そのアンチセンス鎖を増幅したものである。

（配列 h） 5' - G A C T G A A T A T A A A C T T G T G G - 3' （配列番号 8）

（配列 i） 5' - C T A T T G T T G A T C A T A T T C G - 3' （配列番号 9）

PCR 溶液は、TaKaRa Taq（タカラバイオ株式会社製）のプロトコルを参考にして調製した。PCR 反応溶液の組成は以下の通りである。

フォワードプライマー 20 pmol（最終濃度 0.2 μM）

リバースプライマー 300 pmol（最終濃度 3.0 μM）

標的DNA（配列 d） 0.5 ng

TaKaRa Taq（DNAポリメラーゼ） 2.5 U

10 × PCR バッファ 10 μl

2.5 mM dNTP 8 μl

これらを 0.2 ml PCR チューブ中で混合し、さらにオートクレイブ処理した MilliQ 水を加えて全量 100 μl とした。そして、94°C・5 分 → (94°C・30 秒 → 52°C・30 秒 → 72°C・30 秒) × 40 サイクル → 72°C・7 分 → 4°Cまで冷却、というプロトコルで PCR 反応を行い、標的DNA（配列 d）を増幅した。

上述した PCR 反応を行った後、この PCR 反応溶液 40 μl に、pH 緩衝剤（2 M カコジル酸ナトリウム、33 mM EDTA、pH=7.0）を 2.5 μl、それぞれ 100 μM の検出用DNA溶液（上記配列 e, f）を 2.5 μl、1 μM のAMND溶液を 5 μl 添加し、全量を 50 μl とした。得られたDNA溶液について、光路長 3 mm × 3 mm の蛍光測定用セルを用いて蛍光強度を測定した。なお、測定温度は 5°C である。

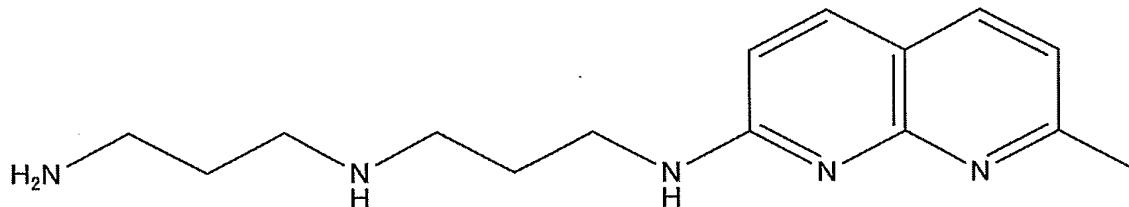
標的DNAの標的塩基NがG（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）

又はT（チミン）である場合の蛍光消光効率（%）を図9に示す。ここで、図9における励起波長は350 nmであり、検出波長は400 nmである。図9に示すように、標的塩基NがC（シトシン）である場合にのみ蛍光が著しく消光している。このように、消光の有無を検出することで、標的塩基NがC（シトシン）であるか否かを知ることができる。また、本実施例では、DNAポリメラーゼやdNTPなどの除去作業や精密な温度制御などが一切不要であるため、PCR産物の迅速且つ簡便な解析が可能である。

#### （第6の実施例）

第6の実施例では、表面プラズモン共鳴（SPR）法による一塩基置換検出について評価した。レセプター分子としては、以下の化学式に示すようなAMND-DPA（N-(3-Amino-propyl)-N'-(7-methyl-[1,8]naphthyridin-2-yl)-propane-1,3-diamine）を用い、これを金基板上に固定化したセンサーチップ（マイクロアレイ）を作製した。

#### 化4



AMND-DPAは、金基板上に固定化するためにアミノ基を末端に有するアルキル鎖をAMNDの基本骨格に導入したもので、2, 6-ジアミノピリジンから合成したものである。このAMND-DPAは、金基板上において2種類の検出用DNAの間のギャップ部位に挿入されたときにC（シトシン）と選択的に相互作用する。この際、標的塩基の違いに基づきSPRの信号強度が変化するため、信号強度を測定することでC（シトシン）が関与する全ての一塩基置換（C/T, C/G, C/A）を検出することができる。

本実施例では、AMND-DPAを固定化したセンサーチップによる一塩基置換検出の効果を検証するために、上述した23merの標的DNA（配列g）と

上述した 11mer の検出用 DNA (配列 b) とをモデル配列として準備した。なお、本実施例においても、1種類の検出用 DNA (配列 b) を標的DNA (配列 g) に対して 2 当量加えることで、標的塩基 N と対向する部位にギャップ部位を構築した。

具体的に、本実施例では、被検体となる 25 μM の標的DNA 溶液（上記配列 g）10 μl に、20 μM の検出用DNA溶液（上記配列 b）を 20 μl 添加し、さらに PBS-E P バッファ（0.67 M リン酸緩衝溶液、1.5 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P 20、pH=6.4）を加えて全量を 500 μl とした。さらに、得られたDNA溶液についてサーマルサイクラーを用いてアニーリング処理した。

また、センサーチップとしてはセンサーチップ CM5（ビアコア株式会社製）を用い、AMND-DPA のセンサーチップへの固定化は、アミンカップリングキット（ビアコア株式会社製）を用いて行った。具体的には、センサーチップ CM5 に 50 μl の NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）／EDC（N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride）水溶液をインジェクトし、センサーチップ表面のカルボキシル基を NHS で活性化した。続いて、0.20 mg/ml（0.73 mM）の AMND-DPA 溶液（10 mM 酢酸緩衝液で希釈したもの、pH=5.5）をインジェクトし、AMND-DPA を基板上に固定化した。その後、1 M エタノールアミン水溶液 50 μl をインジェクトすることによって、残存する活性 NHS 基をブロッキングし、さらに 8 mM NaOH 水溶液 60 μl を用いて基板を洗浄した。

標的DNAの標的塩基 N が G（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）又は T（チミン）である場合の SPR の信号強度（RU：Response Unit）を図 10 に示す。ここで、SPR 測定に用いたDNA溶液量は 90 μl であり、これを 30 μl / 分の流速でインジェクトした。図 10 は、インジェクトの後、180 秒後の SPR 信号強度を示したものである。なお、AMND-DPA の固定化量は約 0.20 ng/mm<sup>2</sup> であり、測定温度は 5°C である。

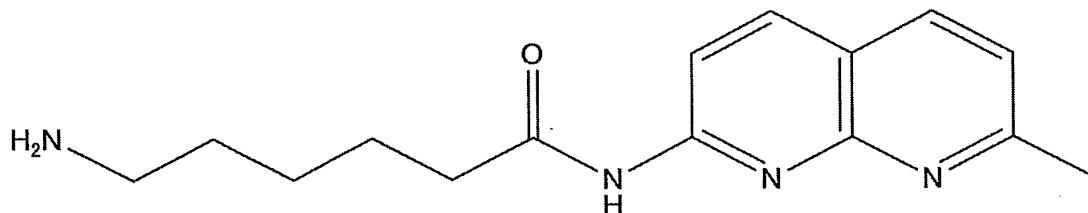
図 10 に示すように、標的塩基 N が C（シトシン）である場合に SPR 信号強度が最大となっている。これは、AMND-DPA がギャップ部位に隣接する核

酸塩基とスタッキングし、さらに標的塩基（C）との水素結合形成により安定な会合体を形成し、その結果、金属板表面近傍の誘電率が変化するためと考えられる。このように、S P Rの信号強度を検出することで、標的塩基NがC（シトシン）であるか否かを知ることができる。すなわち、A M N D - D P Aを固定化したセンサーチップを用いることにより、C（シトシン）が関与する全ての一塩基置換検出が可能である。

#### （第7の実施例）

第7の実施例では、第6の実施例と同様に、表面プラズモン共鳴（S P R）法による一塩基置換検出について評価した。レセプター分子としては、以下の化学式に示すようなA c M N D - C 5 A (6-Amino-hexanoic acid (7-methyl-[1, 8]naphthyridin-2-yl)-amide) を用い、これを金基板上に固定化したセンサーチップを作製した。

#### 化5



A c M N D - C 5 Aは、金基板上に固定化するためにアミノ基を末端に有するアルキル鎖をA M N Dの基本骨格に導入したもので、2, 6-ジアミノピリジンから合成したものである。このA c M N D - C 5 Aは、金基板上において2種類の検出用D N Aの間のギャップ部位に挿入されたときにG（グアニン）と選択的に相互作用する。この際、標的塩基の違いに基づきS P Rの信号強度が変化するため、信号強度を測定することでG（グアニン）が関与する全ての一塩基置換（G／C, G／A, G／T）を検出することができる。

本実施例では、A c M N D - C 5 Aを固定化したセンサーチップによる一塩基置換検出の効果を検証するために、上述した23merの標的D N A（配列g）と上述した11merの検出用D N A（配列b）とをモデル配列として準備した。

なお、本実施例においても、1種類の検出用DNA（配列b）を標的DNA（配列g）に対して2当量加えることで、標的塩基Nと対向する部位にギャップ部位を構築した。

具体的に、本実施例では、被検体となる $200\mu M$ の標的DNA溶液（上記配列g） $5\mu l$ に、 $400\mu M$ の検出用DNA溶液（上記配列b）を $5\mu l$ 添加し、さらにPBS-EPバッファ（0.67Mリン酸緩衝液、1.5MNaCl、3mM EDTA、0.005% Surfactant P 20、pH=6.4）を加えて全量を $500\mu l$ とした。さらに、得られたDNA溶液についてサーマルサイクラーを用いてアニーリング処理した。

また、センサーチップとしてはセンサーチップCM5（ビアコア株式会社製）を用い、AcMND-C5Aのセンサーチップへの固定化は、アミンカップリングキット（ビアコア株式会社製）を用いて行った。具体的には、センサーチップCM5に $50\mu l$ のNHS/EDC水溶液をインジェクトし、センサーチップ表面のカルボキシル基をNHSで活性化した。続いて、 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ （3.7mM）のAcMND-C5A溶液（10mM酢酸緩衝液で希釈したもの、pH=5.5）をインジェクトし、AcMND-C5Aを基板上に固定化した。その後、1Mエタノールアミン水溶液 $50\mu l$ をインジェクトすることによって、残存する活性NHS基をブロッキングし、さらに8mM NaOH水溶液 $60\mu l$ を用いて基板を洗浄した。

標的DNAの標的塩基NがG（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）又はT（チミン）である場合のSPRの信号強度（RU：Response Unit）を図11に示す。ここで、SPR測定に用いたDNA溶液量は $60\mu l$ であり、これを $20\mu l/\text{分}$ の流速でインジェクトした。図11は、インジェクトの後、180秒後のSPR信号強度を示したものである。なお、AcMND-C5Aの固定化量は約 $1.6\text{ng}/\text{mm}^2$ であり、測定温度は $5^\circ\text{C}$ である。

図11に示すように、標的塩基NがG（グアニン）である場合にSPR信号強度が最大となっている。これは、AcMND-C5Aがギャップ部位に隣接する核酸塩基とスタッキングし、さらに標的塩基（G）との水素結合形成により安定な会合体を形成し、その結果、金属板表面近傍の誘電率が変化するためと考えら

れる。このように、S P R の信号強度を検出することで、標的塩基NがG（グアニン）であるか否かを知ることができる。すなわち、A c M N D - C 5 Aを固定化したセンサーチップを用いることにより、G（グアニン）が関与する全ての一塩基置換検出が可能である。

以上、具体的な実施例からも分かるように、本実施の形態における遺伝子変異検出方法によれば、連続した1以上の塩基からなる標的塩基11を有する一本鎖の標的核酸10と、この標的塩基11を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bとで二本鎖核酸を形成し、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプター分子30を添加して標的塩基11と水素結合を形成させ、レセプター分子30と結合した二本鎖核酸の蛍光強度を測定することにより、一塩基置換等の遺伝子変異を効果的に検出することができる。

特に、被検体となる標的核酸10のラベル化や熱制御等の煩雑な操作が不要であるため工程数が非常に少なく、また、原理上二本鎖DNA自体の熱的な安定性に依存しないため、検出までの時間が非常に短時間であり、再現性にも優れてい る。また、UVランプを用いた目視による確認も可能であるため、特別な設備を持たない状況下においても検出が可能である。

さらに、レセプター分子30又は検出用核酸20aを基板上に多数集積したセンサーチップ（マイクロアレイ）を作製し、遺伝子変異検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな検出が可能となる。

なお、上述した実施の形態では、標的塩基を挟む2種類の部分配列と相補的な2種類の検出用核酸と標的核酸とをハイブリダイゼーションさせることで、意図的にギャップ部位を導入したが、このギャップ部位は、DNAの修復過程にも生じることが知られている（文献「Erling Seeberg, Lars Eide and Magnar Bjoras, Trend. Biochem. Sci., 1995, 20(10), pp. 391-397」を参照。）。そこで、図2に示したようにレセプター分子が固定化された基板に二本鎖DNA溶液を滴下して反応させることで、DNAの損傷の有無を検出することも可能である。

## 産業上の利用可能性

上述した本発明によれば、標的核酸と2種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成して標的塩基と対向する位置にギャップ部位を構築し、このギャップ部位に挿入されたレセプターと標的塩基とで水素結合を形成させることにより、標的塩基に生じた一塩基置換等の遺伝子変異を効果的に検出することができる。

また、レセプター又は2種類の検出用核酸の一方を基板上に固定化し、遺伝子変異検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな検出が可能となる。

## 請求の範囲

1. 連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と、上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とで、二本鎖核酸を形成する工程と、

上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプターを挿入させ、上記標的塩基と水素結合を形成させる工程と、

上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度を測定する工程とを有することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

2. 上記レセプターは、複素環式芳香族基を有し、上記標的塩基との水素結合形成及び該レセプターに隣接する塩基とのスタッキング相互作用により安定化されることで、上記標的塩基と対を形成することを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の遺伝子変異検出方法。

3. 上記レセプターは、ナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、ブテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体、アロキサジン誘導体及びアミロライドからなる群の少なくとも 1 つであることを特徴とする請求の範囲第 2 項記載の遺伝子変異検出方法。

4. 連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、

水素結合性及び発蛍光性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと

を有することを特徴とする遺伝子変異検出用キット。

5. 水素結合性を示すレセプターが固定化された基板に、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と、上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とを滴下することにより、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、

上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程と

を有することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

6. 上記レセプターは発蛍光性を示すものであり、上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて上記標的塩基を識別することを特徴とする請求の範囲第5項記載の遺伝子変異検出方法。

7. 上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づく表面プラズモン共鳴の信号強度変化、又は水晶振動子の共振周波数変化に基づいて上記標的塩基を識別することを特徴とする請求の範囲第5項記載の遺伝子変異検出方法。

8. 連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸と、

水素結合性を示し、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、

上記レセプターが固定化された基板と

を有することを特徴とする遺伝子変異検出用キット。

9. 連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸のうち一方の検出用核酸が固定化された基板に、上記標的核酸と、他方の検出用核酸と、水素結合性を示すレセプターとを滴下することにより、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、

上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程と

を有することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

10. 上記レセプターは発蛍光性を示すものであり、上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて上記標的塩基を識別することを特徴とする請求の範囲第9項記載の遺伝子変異検出方法。

11. 連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸におけ

る上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸と、

水素結合性を示し、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、

2種類の上記検出用核酸の一方が固定化された基板と  
を有することを特徴とする遺伝子変異検出用キット。

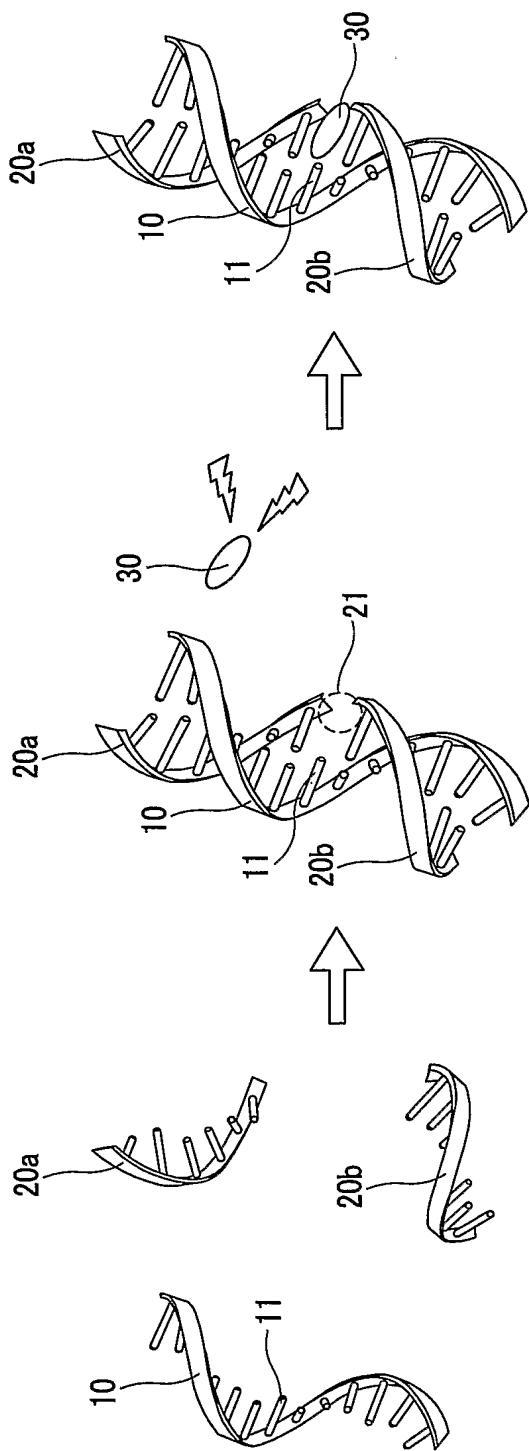


FIG. 1

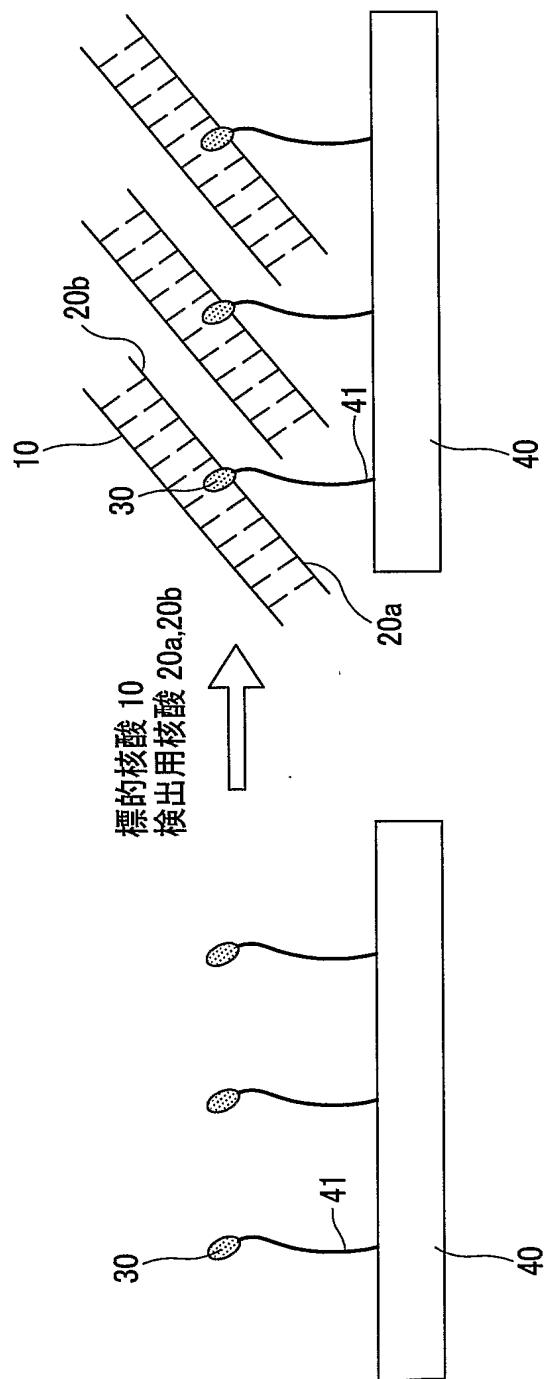


FIG.2

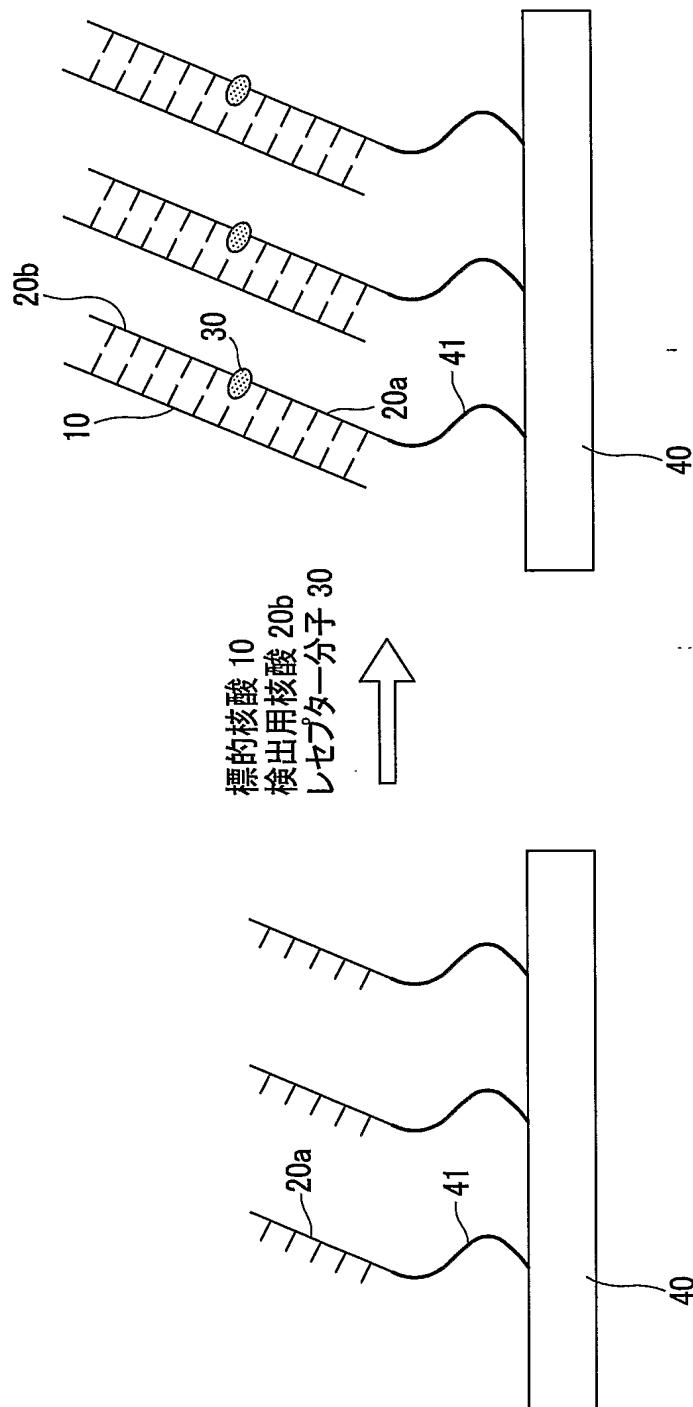


FIG.3

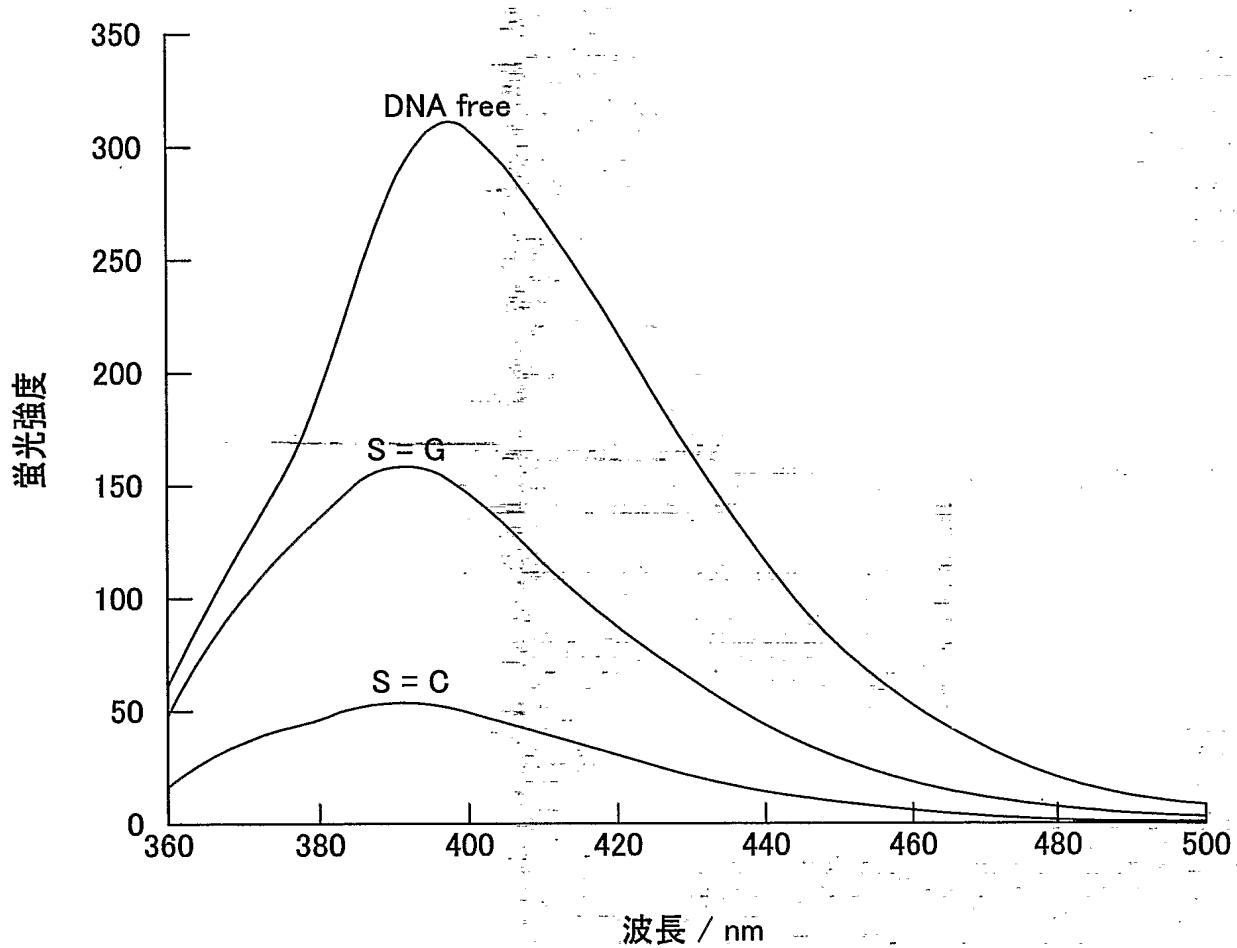


FIG.4

5/11

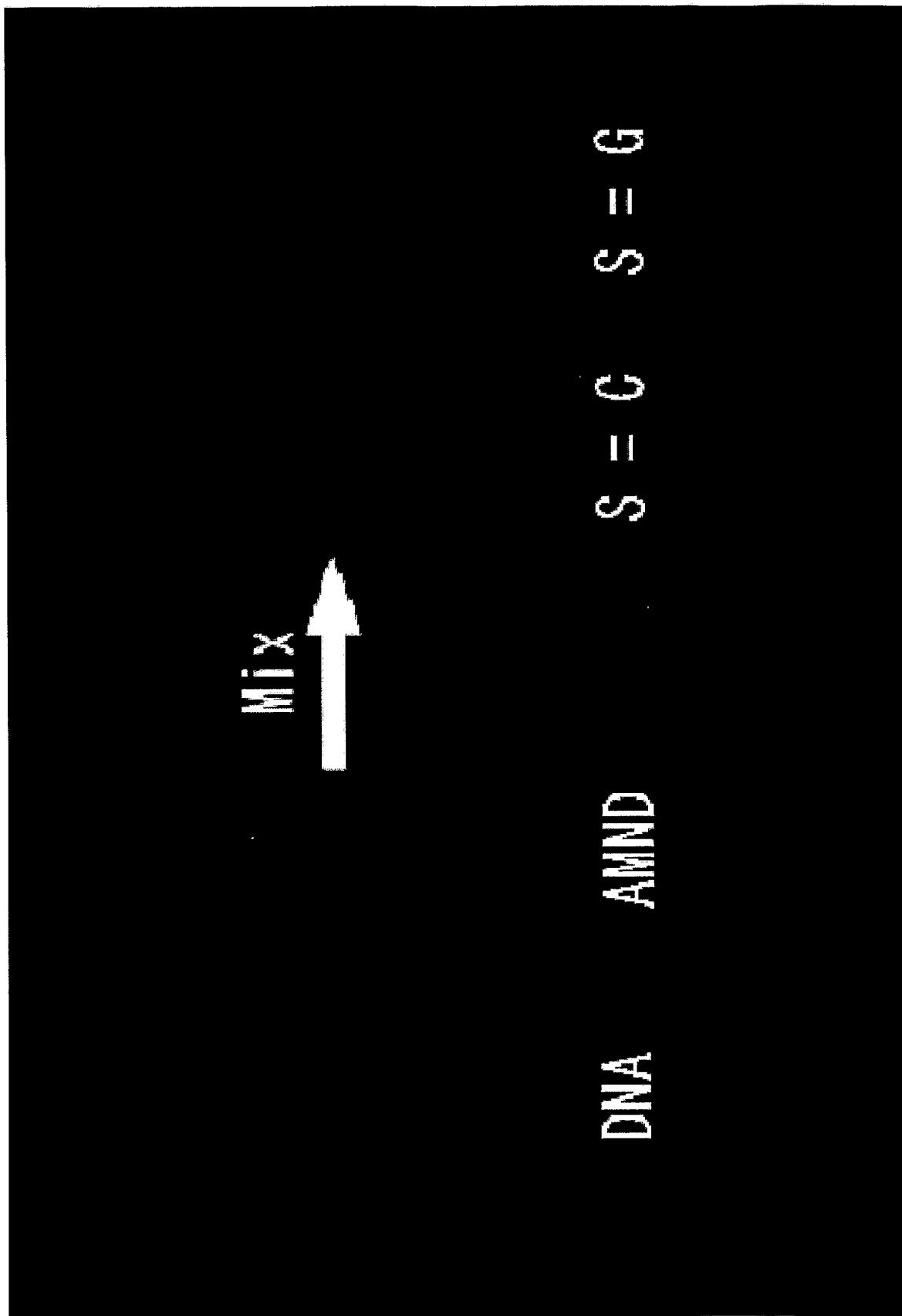


FIG. 5

6/11

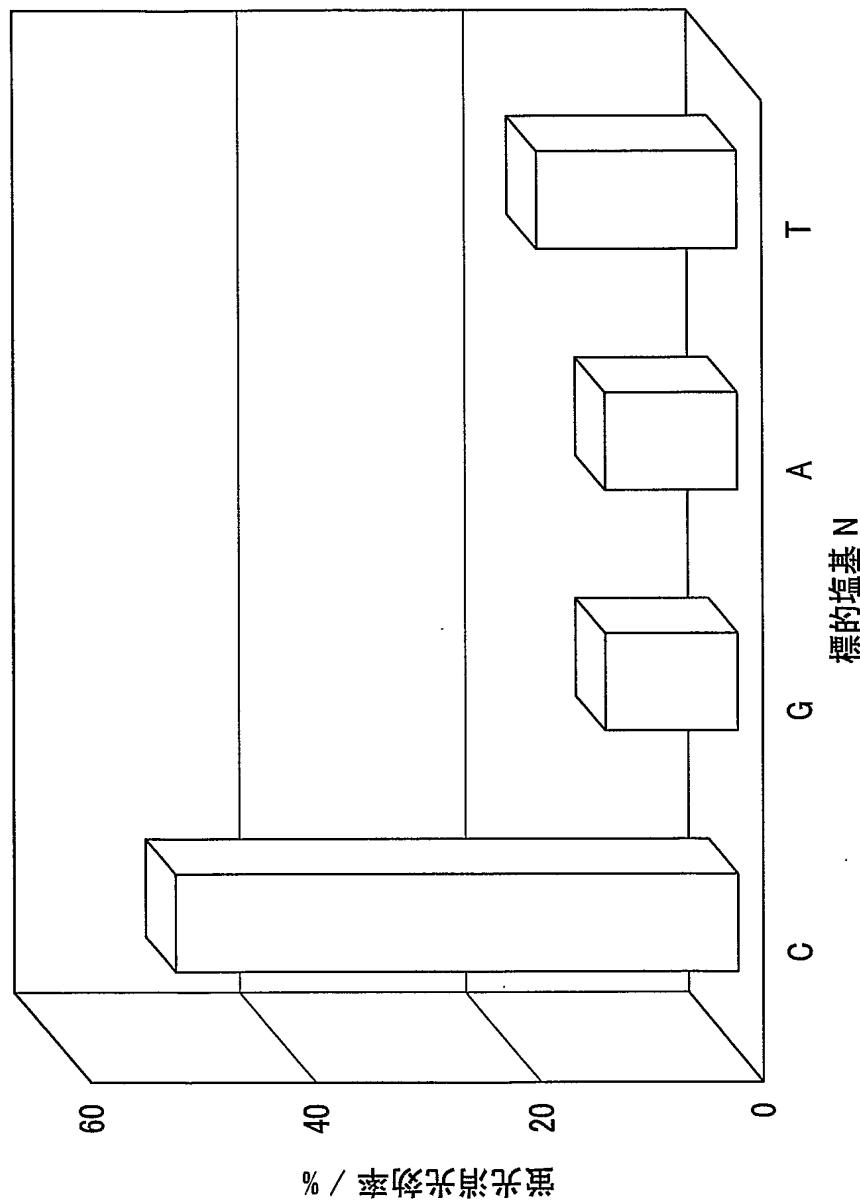


FIG.6

7/11

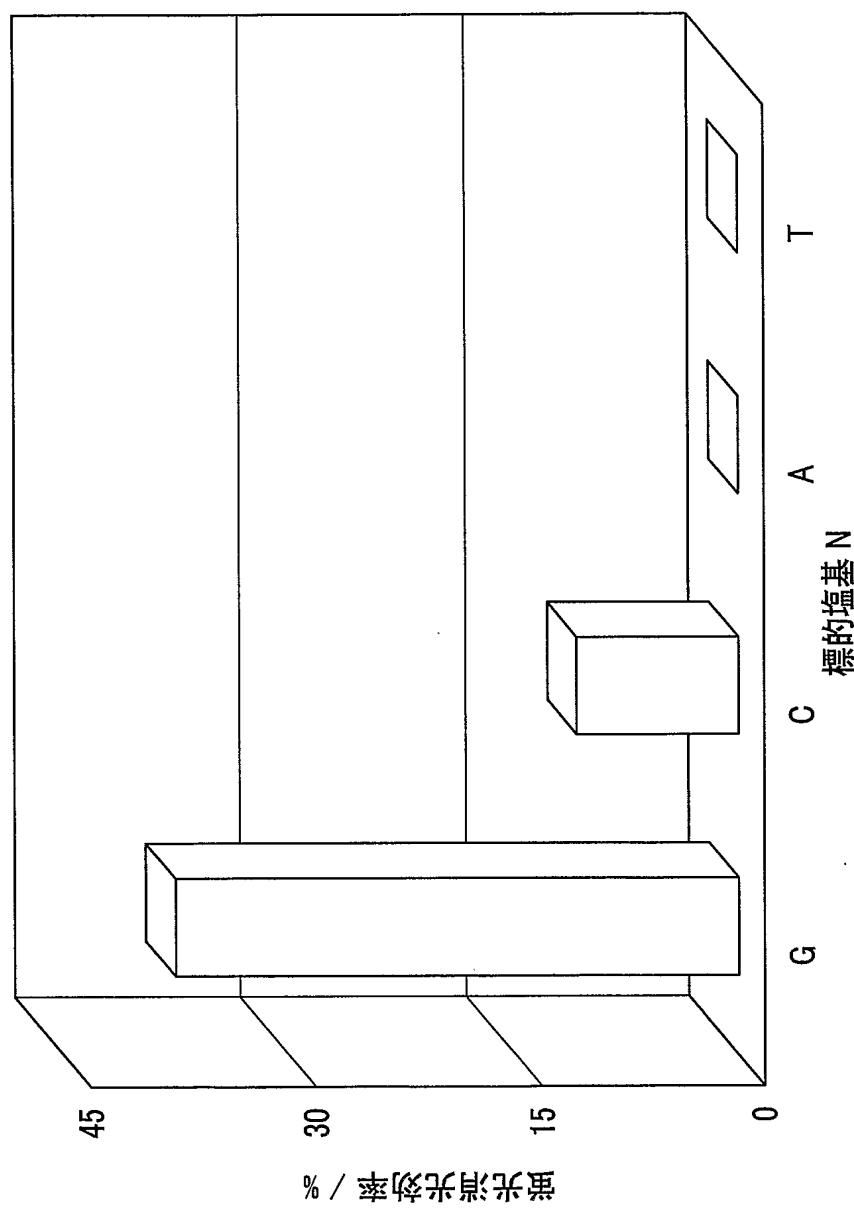


FIG.7

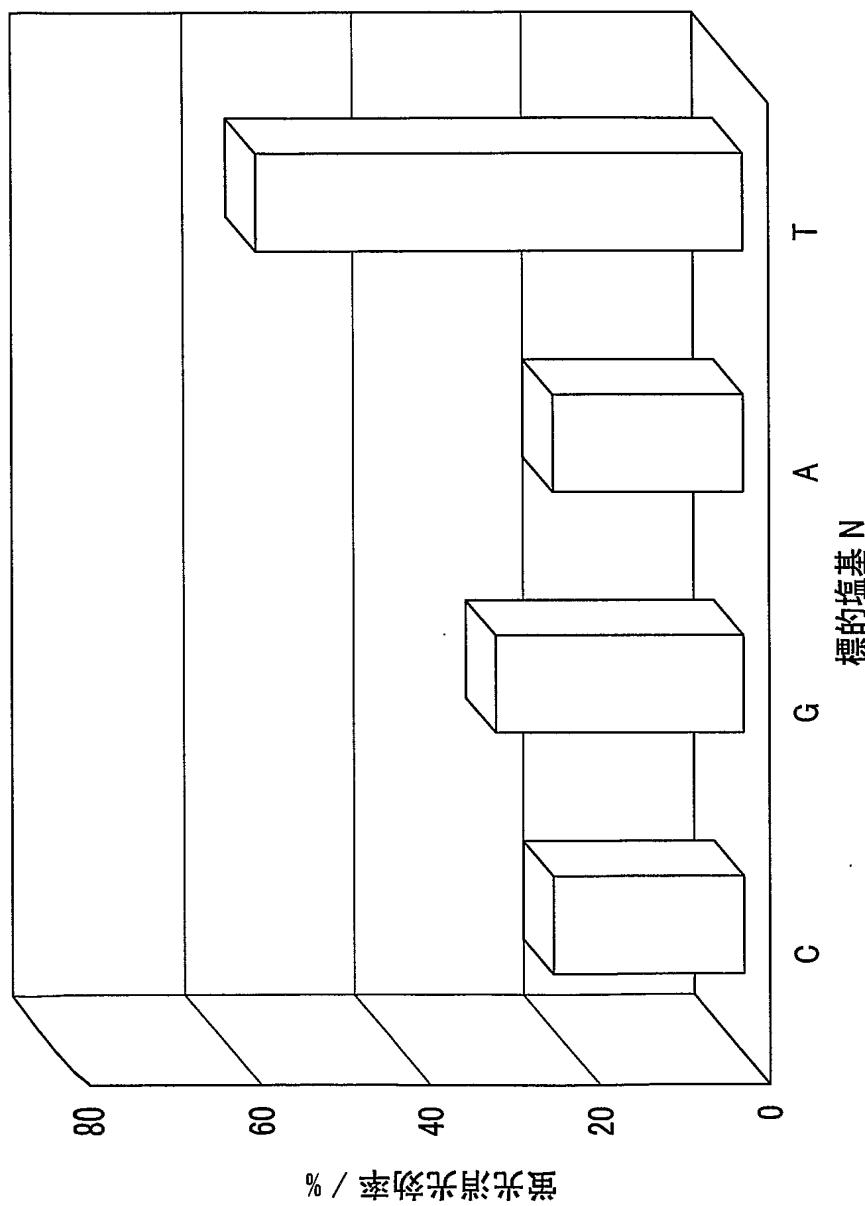


FIG.8

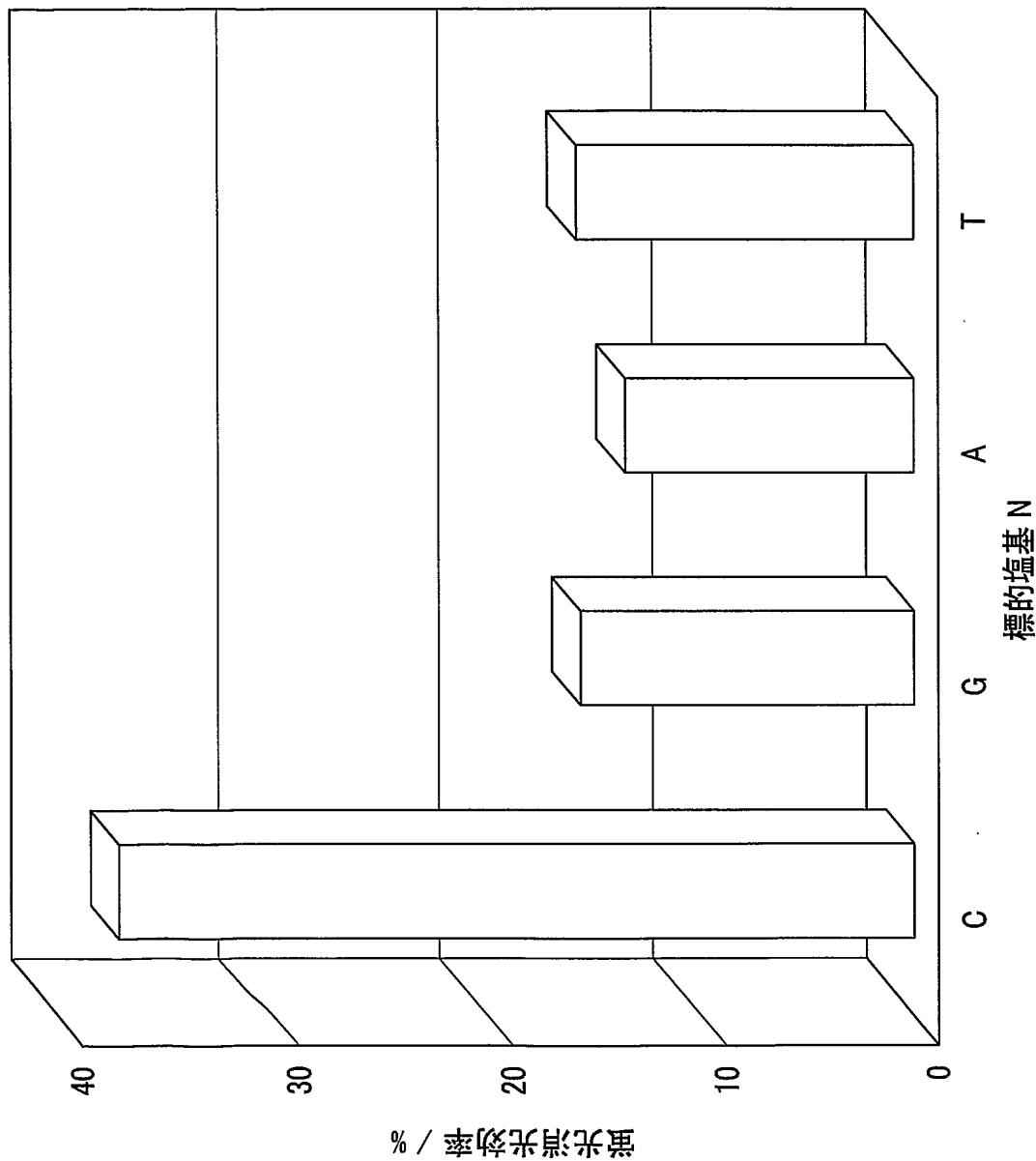
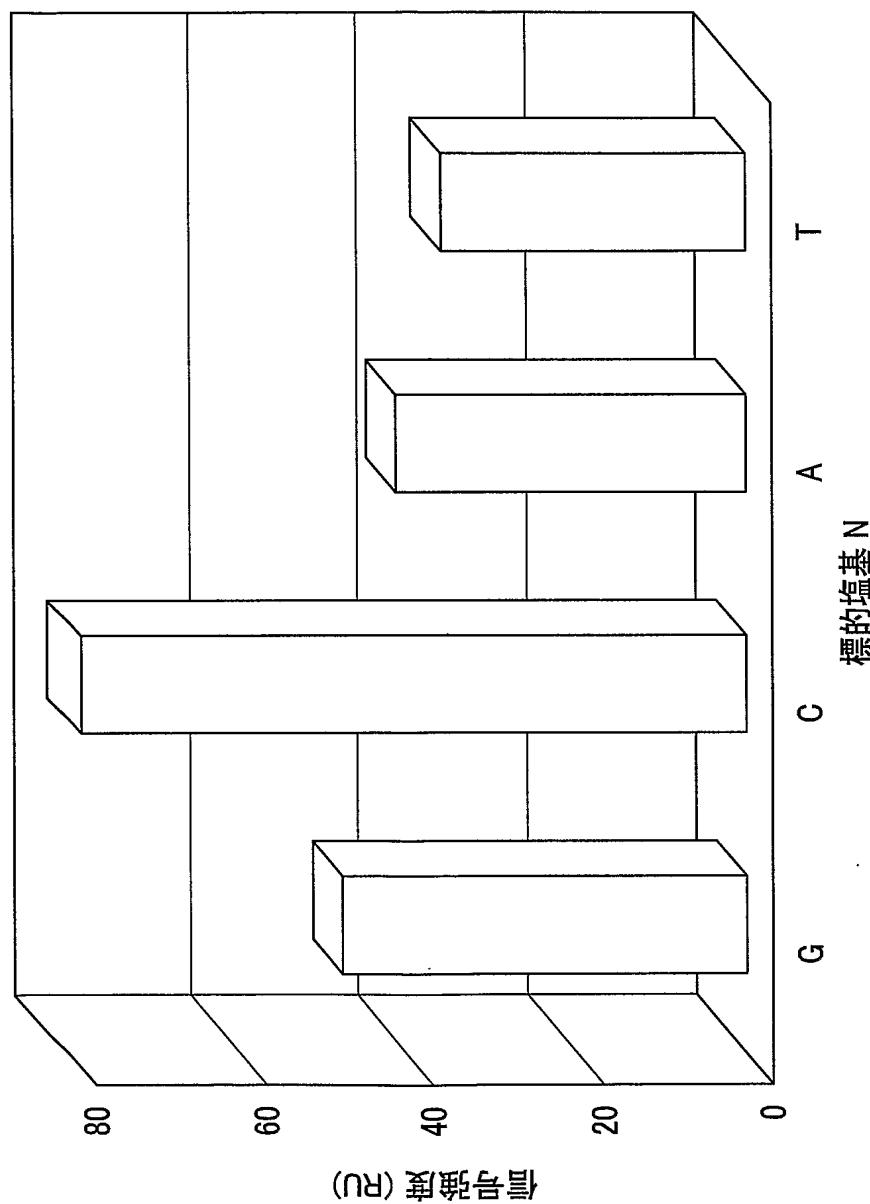


FIG.9

10/11



11/11

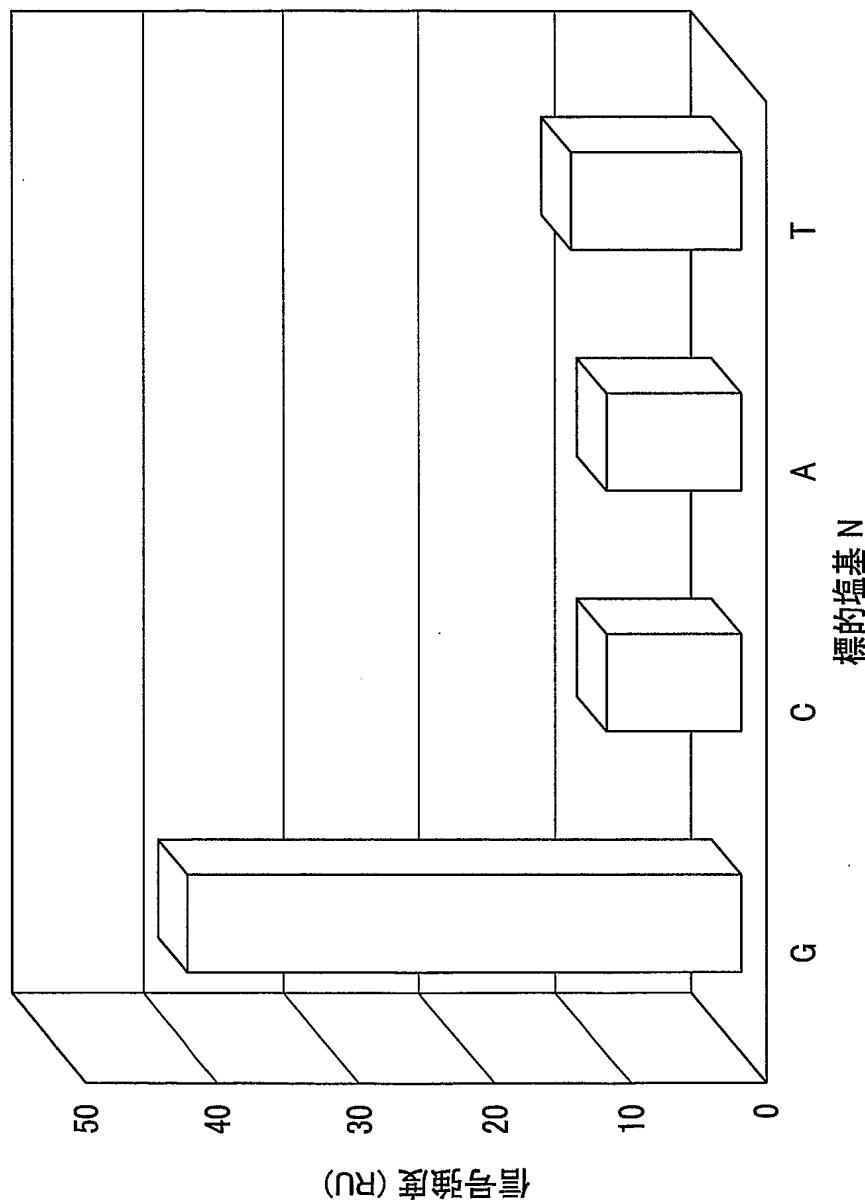


FIG. 11

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> 遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キット

<150> JP 2004-080703

<151> 2004-3-19

<160> 9

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Artificially synthesized sequence

<400> 1

tctccgcaca cstctccccca cac

23

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Artificially synthesized sequence

2/4

&lt;400&gt; 2

gtgtgcggag a

11

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Artificialy synthesized sequence

&lt;400&gt; 3

gtgtggggag a

11

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Artificialy synthesized sequence

&lt;400&gt; 4

ctatttgttgg atcatattcg tccacaaaaat gattctgaat tagctgtatc gtcaaggcac

60

tcttgcc tac gccancagct ccaactacca caagttata tttagtc

107

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

3/4

<223> Artificialy synthesized sequence

<400> 5

tggcgttaggc aagag

15

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Artificialy synthesized sequence

<400> 6

tggtagttgg agctg

15

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Artificialy synthesized sequence

<400> 7

tctccgcaca cntctccgca cac

23

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

4/4

<213> Artificial Sequence

<223> Artificialy synthesized primer sequence

<400> 8

gactgaatat aaaccttgtgg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Artificialy synthesized primer sequence

<400> 9

ctatttgttg atcatattcg

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
**Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N21/78, 33/53, 33/566**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/00-15/90, G01N21/78, 33/53, 33/566**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
**BIOSIS/MEDLINE/WPI/IDS (STN)**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TERAMAE, N. et al., Use of abasic site-containing DNA strands for Nucleobase recognition in water, J.Am.Chem.Soc., 2003, 125, pages 8982 to 8983	1-4, 9-11 5-8
Y	JP 2001-89478 A (Japan Science and Technology Corp.), 03 April, 2001 (03.04.01), (Family: none)	1-11
Y	NAKATANI K. et al., Scanning of guanine-guanine mismatches in DNA by synthetic ligands using surface plasmon resonance., Nat.Biotechnol., 2001, January, 19(1), p.51-5	7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 20 April, 2005 (20.04.05)

Date of mailing of the international search report  
 10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/09, G01N21/78, 33/53, 33/566

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup> C12Q1/68, C12N15/00-15/90, G01N21/78, 33/53, 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Teramae N et al., Use of abasic site-containing DNA strands for Nucleobase recognition in water, J Am Chem Soc, 2003, 125, p. 8982-8983	1-4, 9-11 5-8
Y	JP 2001-89478 A(科学技術振興事業団) 2001.04.03 (ファミリーなし)	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。

「パテントファミリーに関する別紙を参照。」

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20. 04. 2005	国際調査報告の発送日 10. 5. 2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許序審査官（権限のある職員） 伏見 邦彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 9838

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nakatani K et al., Scanning of guanine-guanine mismatches in DNA by synthetic ligands using surface plasmon resonance. Nat Biotechnol, 2001 Jan, 19(1), p. 51-5	7
Y	Nakatani K et al., Improved selectivity for the binding of naphthyridine dimer to guanine-guanine mismatch. Bioorg Med Chem, 2001 Sep, 9(9), p. 2381-5	7
PX	JP 2004-261068 A(寺前紀夫)	1-4, 9-11
PY	2004. 09. 24 (ファミリーなし)	5-8
A	JP 2001-149096 A(科学技術振興事業団) 2001. 06. 05 &US 6607890 B1 &EP 1164202 A1 &WO 2001/038571 A1	1-11
A	Nakatani K et al., Recognition of Guanine-Guanine mismatches by the dimeric form of 2-amino-1,8-naphthyridine, J Am Chem Soc, 2001, 123, p. 12650-12657	1-11